





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	2
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	3
7 Cara uji	3
7 Syarat lulus uji	4
8 Higiene.....	4
9 Pengemasan.....	4
10 Syarat penandaan	4
Lampiran A	5
Bibliografi.....	28
Tabel 1 – Syarat mutu mi kering.....	2

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Mi kering* ini merupakan revisi SNI 01–2974–1996, *Mi kering* dan SNI 01-4283-1996 *Mi kering*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam persyaratan mutu dan cara uji;
2. Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
3. Melindungi kesehatan konsumen;
4. Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
5. Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri mi.

Perubahan yang terjadi pada standar ini adalah:

1. Penyesuaian istilah dan definisi mi kering sehingga diperbolehkan tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan. Proses produksi yang terbagi menjadi dua yaitu digoreng atau dikeringkan;
2. Penambahan pasal komposisi;
3. Penambahan kriteria uji yaitu bilangan asam, kadar abu tidak larut dalam asam, dan penyesuaian nilai dan kriteria uji cemaran logam dan cemaran mikroba sesuai dengan ketentuan yang berlaku pada syarat mutu;
4. Penyesuaian metode uji mengacu standar terkini.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
2. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
5. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2014 tentang Perindustrian.
6. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2014 tentang Standardisasi dan Penilaian Kesesuaian.
7. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
8. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
10. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
11. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033 Tahun 2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.06.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.
13. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.

Standar ini dirumuskan oleh **Komite Teknis 67-04, Makanan dan Minuman**, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 April 2014 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 16 Februari 2015 dengan perpanjangan satu bulan sampai dengan tanggal 14 Mei 2015 dengan hasil akhir RASNI.



Mi kering

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, komposisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji mi kering.

2 Acuan normatif

Acuan berikut merupakan bagian tidak terpisahkan untuk penggunaan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang diacu digunakan. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemen) digunakan.

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 6887-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1: Aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*.

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*.

SNI ISO 6888-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird Parker Agar*.

SNI ISO 7251, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*.

SNI ISO 7932, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi Bacillus cereus terduga – Teknik penghitungan koloni pada suhu 30 °C*.

SNI ISO 21527-2, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 2: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air kurang dari atau sama dengan 0,95*.

3 Istilah dan definisi

3.1

mi kering

produk yang dibuat dari bahan baku utama tepung terigu dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan melalui proses pencampuran, pengadukan, pencetakan lembaran (*sheeting*), pembuatan untaian (*slitting*), dengan atau tanpa pengukusan (*steaming*), pemotongan (*cutting*) berbentuk khas mi, digoreng atau dikeringkan.

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Tepung terigu.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan yang sesuai untuk mi kering.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk mi kering sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

5 Syarat mutu

Syarat mutu mi kering sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu mi kering

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Digoreng	Dikeringkan
1	Keadaan			
1.1	Bau	-	normal	normal
1.2	Rasa	-	normal	normal
1.3	Warna	-	normal	normal
1.4	Tekstur	-	normal	normal
2	Kadar air	fraksi massa,%	maks. 8	maks. 13
3	Kadar protein (N x 6,25)	fraksi massa,%	min. 8	min. 10
4	Bilangan asam	mg KOH/g minyak	maks. 2	-
5	Kadar abu tidak larut dalam asam	fraksi massa,%	maks. 0,1	maks. 0,1
6	Cemaran logam			
6.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0	maks. 1,0
6.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2	maks. 0,2
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0	maks. 40,0
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,05	maks. 0,05

Tabel 1 - Syarat mutu mi kering (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan	
			Digoreng	Dikeringkan
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5	maks. 0,5
8	Cemaran mikroba			
8.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^6	maks. 1×10^6
8.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	maks. 10	maks. 10
8.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3	maks. 1×10^3
8.4	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3	maks. 1×10^3
8.5	Kapang	koloni/g	maks. 1×10^4	maks. 1×10^4
9	Deoksinivalenol	µg/kg	maks. 750	maks. 750

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk mi kering seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1;
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2;
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
 - Cara uji tekstur sesuai Lampiran A.2.4
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3;
- d) Cara uji kadar protein sesuai Lampiran A.4;
- e) Cara uji bilangan asam sesuai Lampiran A.5;
- f) Cara uji kadar abu tak larut dalam asam sesuai Lampiran A.6;
- g) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7;
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- h) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8;
- i) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9;
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan Lampiran 9.1, SNI ISO 6887-1, dan SNI ISO 6887-4;
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2;
 - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai dengan SNI ISO 7932;
 - Cara uji *E. coli* sesuai dengan SNI ISO 7251;
 - Cara uji *S. aureus* sesuai dengan SNI ISO 6888-1;
 - Cara uji kapang sesuai dengan SNI ISO 21527-2;
- j) Cara uji deoksinivalenol sesuai Lampiran A.10

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

9 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Label dan Iklan Pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji mi kering

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji keadaan dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji keadaan

Buka kemasan contoh mi kering dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh mi kering dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam wadah yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh mi kering dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam wadah steril.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengujian contoh dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Pengujian contoh dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh dengan indera penglihat (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat warna contoh uji;
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna sesuai dengan yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika terlihat warna lain selain warna yang tercantum dalam label maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.4 Tekstur

A.2.4.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian keadaan.

A.2.4.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji dan letakkan di atas wadah yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui teksturnya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimum oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.4.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tekstur terasa normal, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
Jika tekstur tidak normal, maka disebutkan tekstur yang diamati

A.3 Kadar Air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- a) Oven ;
- b) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) desikator; dan
- d) cawan aluminium bertutup dengan diameter 50 mm dan tinggi/ kedalaman kurang dari atau sama dengan 40 mm.

A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan disamping cawan di dalam oven pada temperatur $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 jam setelah temperatur oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;
- d) tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang, kemudian timbang hingga diperoleh bobot konstan (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Kadar protein ($N \times 6,25$)

A.4.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

A.4.2 Peralatan

- Alat destilasi *Kjeldahl* konvensional atau otomatis;
- alat destruksi;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik; dan
- buret 10 mL.

A.4.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 ;
- larutan katalis tembaga, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bebas nitrogen 0,05 g/mL H_2O ;
larutkan 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling menjadi 100 mL, lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
- katalis selen;
campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 anhidrat dan 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- larutan *indicator methyl red* (MR) dan *bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95% menjadi 100 mL. Larutkan 1 g *bromocresol green* dengan etanol 95% menjadi 500 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan dalam botol bertutup gelas.
- larutan asam borat, H_3BO_3 4%;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1 000 mL dan tambahkan 3 mL larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan natrium hidroksida, NaOH 30%;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2 000 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- larutan indikator fenoltalein (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 %, dan encerkan menjadi 100 mL.
- larutan asam klorida, HCl 0,1 N.
pipet dengan hati-hati 8,60 mL HCl pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan tentukan normalitasnya.

A.4.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh ke dalam labu *Kjeldahl* (W), tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 mL larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 butir sampai dengan 10 butir batu didih dan 25 mL H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit penghisapan asap;
- biarkan dingin, lalu encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 mL larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga larutan menjadi basa);
- sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampungan destilat adalah 50 mL larutan H_3BO_3 4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 N (V_1); dan
- kerjakan penetapan blanko (V_2).

A.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 5,71 \times 100\%}{W}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 V_2 adalah volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N adalah normalitas larutan HCl, dinyatakan dalam Normalitas (N);
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
 6,25 adalah faktor konversi untuk protein.

A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Bilangan asam

A.5.1 Prinsip

Bilangan asam minyak sama dengan mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan 1 g minyak. Minyak yang diekstraksi dari mi kering yang digoreng dilarutkan dalam campuran alkohol eter dan dititrasi dengan larutan standar KOH alkohol.

A.5.2 Peralatan

- Desikator;
- labu ukur 1 L;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- titrator;
- rotary evaporator*;
- labu *Erlenmeyer* 200 mL;
- penangas air temperatur dapat dipertahankan 40 °C.

A.5.3 Pereaksi

- Larutan standar kalium hidroksida alkohol: 0,05 mol / L;
 Larutkan 3,5 g kalium hidroksida dalam volume yang sama dari air (bebas CO₂) dan etanol (95 %) tepatkan volume menjadi 1 liter. Setelah tercampur, biarkan larutan selama beberapa hari, jaga larutan bebas CO₂. Gunakan supernatan setelah dilakukan.
- standardisasi;
 Timbang *amidosulfuric acid* (bahan referensi bersertifikat untuk volumetrik analisis) dan simpan ke dalam desikator (< 2.0 kPa) selama 48 jam. Selanjutnya, timbang dengan teliti 1 g sampai 1,25 g, larutkan dalam air (bebas CO₂), dan encerkan sampai 250 mL. masukan 25 mL larutan ke dalam labu *Erlenmeyer*, tambahkan 2 sampai 3 tetes indikator biru bromotimol dan titrasi dengan 0,05 mol/L larutan kalium hidroksida alkohol sampai warna larutan berubah menjadi biru muda.
 hitung faktor molaritas = (g *amidosulfuric acid* × kemurnian × 25) / 1,2136 / mL KOH
- campuran alkohol-eter: volume yang sama etanol (99,5 %) dan eter;
- larutan fenoltalein 1 % dalam alkohol.

A.5.4 Cara kerja

A.5.4.1 Ekstraksi minyak dari mi

- Timbang 25 g contoh (W) ke dalam labu Erlenmeyer 200 mL;
- hilangkan udara dalam labu Erlenmeyer dengan menambahkan gas N₂;
- tambahkan 100 mL petroleum eter;
- tutup labu dan biarkan selama 2 jam;
- saring supernatan menggunakan kertas saring lalu masukkan ke dalam corong pemisah;
- tambahkan 50 mL petroleum eter ke endapan lalu saring supernatan dengan kertas saring lalu masukkan kembali ke dalam corong pemisah;
- tambahkan 75 mL air ke dalam corong pemisah, lalu kocok dengan baik;
- biarkan lapisan memisah dan alirkan lapisan air;
- tambah kembali air lalu kocok. Setelah itu alirkan kembali lapisan air seperti butir h;
- sesudah didehidrasi dengan Na₂SO₄, tampung lapisan petroleum eter dan masukkan ke dalam labu *evaporator*;
- uapkan lapisan petroleum eter menggunakan *rotary evaporator* dengan temperatur tidak lebih dari 40 °C;
- semprot gas N₂ ke dalam labu *evaporator* untuk menghilangkan semua petroleum eter.

A.5.4.2 Titrasi

- Timbang 1 sampai 2 g minyak hasil ekstraksi dari A.5.4.1 ke dalam labu *Erlenmeyer* (W);
- tambahkan 80 mL campuran alkohol eter dan beberapa tetes larutan fenolftalein;
- titrasi dengan 0,05 mol/L KOH alkohol sampai muncul warna merah muda yang dapat dipertahankan selama lebih dari 30 detik (V₁);
- lakukan uji blangko hanya menggunakan campuran alkohol eter dan larutan fenolftalein (V₀).

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Bilangan asam (mg KOH/g minyak)} = \frac{(V_1 - V_0) \times M \times 2,806}{W}$$

Keterangan:

- V₁ adalah volume KOH-alkohol yang diperlukan dalam penitaran blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- V₂ adalah volume KOH-alkohol yang diperlukan dalam penitaran contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- M adalah faktor molaritas larutan KOH -alkohol, dinyatakan dalam molaritas (M);
- W adalah bobot contoh yang diuji, dinyatakan dalam gram (g);
- 2,806 adalah bobot setara KOH-alkohol.

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimum 5 % dari nilai rata-rata hasil bilangan asam. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Abu tidak larut dalam asam

A.6.1 Prinsip

Bagian abu yang tidak larut dalam asam.

A.6.2 Peralatan

- a) Tanur ;
- b) pemanas listrik;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) desikator;
- e) cawan porselen/kuarsa volume 30 mL hingga 50 mL;
- f) penangas air;
- g) kertas saring tak berabu (Whatman No. 40 atau yang setara).

A.6.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida, HCl pekat;

A.6.4 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada temperatur $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- a) Masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- b) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut pada pemanas listrik hingga menjadi arang, kemudian tempatkan dalam tanur pada temperatur $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- c) larutkan abu dengan menambahkan 5 mL HCl pekat;
- d) panaskan sampai mendidih, lalu uapkan campuran sampai kering di atas penangas air;
- e) lanjutkan pemanasan residu yang diperoleh pada butir (d) di atas penangas air selama 30 menit;
- f) tambahkan 5 mL HCl pekat terhadap residu yang diperoleh pada butir (e) dan panaskan sampai mendidih. Lalu tambahkan 20 mL air suling dan panaskan;
- g) saring larutan dengan kertas saring tak berabu (Whatman No. 40 atau yang setara) dan cuci dengan 150 mL air suling panas sampai bebas klorida;
- h) masukkan kertas saring ke dalam cawan porselen/kuarsa yang telah diketahui bobotnya keringkan dalam tanur $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih;
- i) pindahkan segera ke dalam desikator sehingga temperaturnya sama dengan temperatur ruang kemudian timbang (W_2), Penimbangan diulangi sampai bobot tetap.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Kadar abu tidak larut dalam asam} = \frac{(W_2 - W_0)}{(W_1 - W_0)} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dalam g;

W_1 adalah bobot cawan + contoh sebelum diabukan ;

W_2 adalah bobot cawan + abu setelah ditambahkan asam, disaring dan dipanaskan.

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan minimum 5% dari nilai rata-rata hasil abu tidak larut dalam asam. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemaran logam

A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimum 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.7.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 ml HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.
- Larutan baku 20 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/mL Cd.
- Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,2 µg/mL; 0,4 µg/mL; 0,8 µg/mL; 1,4 µg/mL dan 1,8 µg/mL Cd.

- i) Larutan baku 1 000 µg/mL Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/mL siap pakai.
- j) Larutan baku 50 µg/mL Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 µg/mL Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/mL.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 µg/mL kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL dan 2,0 µg/mL Pb.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada temperatur (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N sebanyak 10 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorban sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL);
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran *Relative Standard Deviation* (RSD) dari dua kali ulangan maksimum 16 %, jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)**A.7.2.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- a) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn);
- b) tanur dengan ketelitian 1 °C;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) penangas air;
- f) labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- g) pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) gelas ukur 50 mL; dan
- j) gelas piala 250 mL.

A.7.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida (KCl) 10 mg/mL;
larutkan 1,91 g KCl dengan air suling menjadi 100 mL.
- b) asam nitrat (HNO_3) pekat;
- c) asam klorida (HCl) pekat;
- d) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada temperatur ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, keringkan dalam oven 120 °C, tambahkan 30 mL HNO_3 pekat dan biarkan 15 menit (jangan tambahkan HNO_3 ke dalam contoh jika tahapan destruksi tidak dapat diselesaikan dalam hari yang sama);
- b) panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;

- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.7.3.2 Peralatan

- a) SSA yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) ;
- b) *microwave digester*;
- c) neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) pemanas listrik;
- e) pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) tabung destruksi;
- g) labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL ;
- i) gelas ukur 25 mL;
- j) pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret ; dan
- k) gelas piala 500 mL.

A.7.3.3 Perekasi

- a) Larutan asam sulfat (H_2SO_4) 9 M;
- b) larutan asam nitrat (HNO_3) 7 M;
- c) campuran asam nitrat: asam perklorat ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$) 1:1;
- d) hidrogen peroksida (H_2O_2) pekat;
- e) larutan natrium molibdat ($\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2%;
- f) larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai temperatur ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) larutan natrium borohidrida (NaBH_4);
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg; dan
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- l) larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- m) batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran asam nitrat : asam perklorat ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$) 1 : 1 melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai temperatur ruang;

- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemaran arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang maksimum 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- SSA yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG);
- tanur dengan ketelitian 1°C ;
- microwave digester*;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik;
- bunsen burner*;
- labu *Kjeldahl* 250 mL;
- labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- gelas ukur 25 mL;
- pipet volumetrik 25 mL;
- pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret;
- pawan porselen 50 mL; dan
- gelas piala 200 mL.

A.8.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- asam perklorat, HClO_4 pekat;
- ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;

pipet 10 mL larutan baku As 1 000 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 µg/mL As.

m) larutan baku 1 µg/mL As; dan

pipet 1 mL larutan baku As 100 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 µg/mL As.

n) larutan baku kerja As.

pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 µg/mL As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL dan 0,05 µg/mL As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO₃ pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H₂SO₄ pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO₃ pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 2 mL HClO₄ 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO₄, tambahkan lagi sedikit HNO₃ pekat);
- dinginkan, tambahkan 15 mL H₂O dan 5 mL (NH₄)₂C₂O₄ jenuh;
- panaskan sehingga timbul uap SO₃ di leher labu;
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimum 2 menit;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi (NaBH₄) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 0,5 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 7 mL HNO₃, 1 mL H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan Mg(NO₃)₂, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan temperatur 450 °C (± 1 jam);

- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20%, biarkan minimum 2 menit dan tepatkan sampai tanda tera pada labu takar 50 mL. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *bunsen burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter (µg/mL);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

Kisaran RSD dari dua kali ulangan maksimum 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- a) Blender peristaltik (*stomacher*) dengan kantong plastik steril atau homogenizer berputar (blender) dengan kecepatan tidak tetap antara 8 000 r/min dan 45 000 r/min;
- b) autoklaf;
- c) neraca kapasitas 2 000 g dengan ketelitian 0,1 g;
- d) pemanas listrik;
- e) labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL;
- f) gelas piala steril;
- g) *Erlenmeyer* steril;
- h) botol pengencer steril;
- i) pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL, dilengkapi dengan *bulb pipettor*;
- j) tabung reaksi; dan

k) sendok, gunting, dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan pengencer untuk Angka lempeng total

Buffered peptone water (BPW)

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh untuk Angka lempeng total

- Timbang 25 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada temperatur $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- oven/alat sterilisasi kering dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- autoklaf;
- penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- alat penghitung koloni;
- botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimum 15 mm x 90 mm), steril.

A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

a) *Buffered peptone water (BPW)*

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

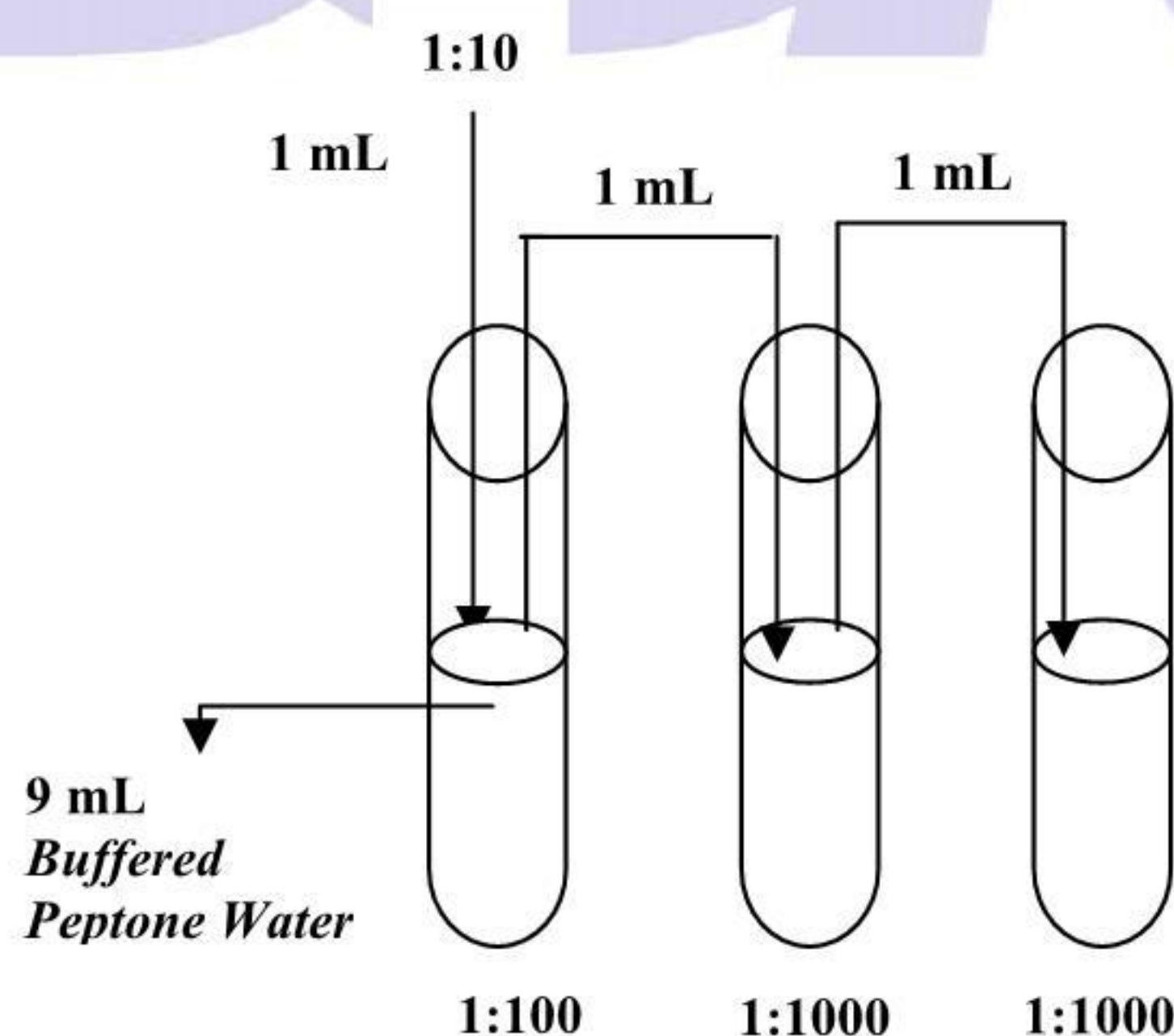
b) *Plate count agar* (PCA)

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| - Yeast extract | 2,5 g |
| - Pancreatic digest of caseine | 5 g |
| - Glukosa | 1 g |
| - Agar | 15 sampai dengan 20 g |
| - Air suling | 1 L |

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

A.9.2.4` Cara kerja

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran 10^{-1} – 10^{-4} atau sesuai keperluan ke dalam cawan Petri steril secara duplo;
- ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bertemperatur (45 ± 1) °C dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama;
- goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku;
- masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada temperatur 30 °C selama 72 jam;
- catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam;
- hitung angka lempeng total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).

A.9.2.5` Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mL (koloni/mL);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.9.2.6` Pernyataan hasil**A.9.2.6.1` Cara menghitung**

- a) Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;

n_1 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000$ (6.5×10^6)
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000$ (5.9×10^6)

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 - perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
 - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.
- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah (<10).

A.9.2.6.2` Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.10 Deoksinivalenol

A.10.1 Prinsip

Deoksinivalenol (DON) dipisahkan dengan cara diekstraksi secara selektif dengan kolom, ditetapkan secara Kromatografi Gas (KG).

A.10.2 Peralatan

- a) Kromatografi Gas (KG);
- b) sentrifus;
- c) kolom untuk larutan uji;
- d) kertas saring standar kromatografi dengan retensi ukuran partikel $20\,\mu\text{m}$;
- e) tabung reaksi kaca borosilikat *disposable*, $125 \times 1\,\text{cm}$;
- f) *mixer* tabung vorteks; dan
- g) pemanas tabung reaksi;

A.10.3 Pereaksi

- a) Larutan stok deoksinivalenol (DON);
Larutkan 1,0 mg DON dalam 10 mL metanol, simpan dalam *freezer*, DON dapat terurai kembali dalam metanol setelah 30 hari.
- b) asam heptafluorobutirat anhidrat (AHFBA);
- c) gel silika berukuran 10 μm - 40 μm ;
Panaskan 25 g gel silika pada temperatur 110 °C selama 3 jam, lalu didinginkan pada temperatur ruang dalam desikator, tambahkan 1,5 mL H₂O, kocok sampai sepenuhnya bercampur, dan simpan selama semalam dalam wadah yang kedap udara.
- d) pelarut yaitu metanol, aseton, CH₃CN, toluena, n-heksana, CH₂Cl₂ dan CHCl₃, semua terdetilasi dalam gelas, etanol absolut; dan
Catatan: CHCl₃ adalah bersifat karsinogenik
- e) katalis 4-Dimetilaminopiridina (4-DMAP) dengan kemurnian minimum 99 %.
Siapkan larutan katalis yang mengandung 2mg/mL dengan melarutkan 100 mg 4-DMAP dalam 50 mL toluena-CH₃CN (dengan rasio 95:5).

A.10.4 Cara Kerja**A.10.4.1 Ekstraksi contoh mi kering**

- a) Gerus contoh sampai bisa melewati saringan berukuran 2 mm;
- b) timbang 25 g contoh dengan ketelitian 0,01 g;
- c) tambahkan 10 mL H₂O dan 125 mL CHCl₃-etil alkohol dengan rasio 8:2;
- d) kocok selama 60 menit;
- e) saring dengan kertas saring berukuran partikel 20 μm pada kondisi vakum hingga diperoleh filtrat;
- f) ambil 10 mL filtrat dan masukkan ke dalam tabung vial berukuran 15 mL;
- g) pekatkan contoh dengan pemanas tabung reaksi dan gas nitrogen; dan
- h) simpan residu untuk pencucian kolom.

A.10.4.2 Pencucian kolom

- a) Siapkan bubur gel silika dengan mengocok 25 g gel silika dan 10 mL CH₂Cl₂;
- b) masukkan tabung uji yang berukuran 16 x 125 mm ke dalam alat sentrifus;
- c) masukkan kolom ke dalam masing-masing tabung uji tersebut;
- d) pipet bubur gel silika sebanyak 5 mL ke dalam masing-masing kolom yang masih kosong (A.10.2.c);
- e) lalu disentrifus dengan kecepatan 1 000 rpm selama 2 menit;
- f) buang cairan yang terkumpul (supernatan) dalam masing-masing tabung uji;
- g) larutkan residu (pelet) dengan 3 mL CH₂Cl₂, dalam tabung pencampur dan divorteks, lalu pindahkan ke dalam kolom;
- h) bilas tabung vial dengan 2 mL CH₂Cl₂ dan tambahkan pembilas ke dalam kolom;
- i) sentrifus kumpulan kolom di atas tersebut dengan kecepatan 1 000 rpm selama 2 menit;
- j) buang cairan (supernatan) dalam tabung uji;
- k) dengan cara yang sama seperti di atas, cuci kolom dengan 10 mL toluene – aseton (dengan rasio 80 : 20);
- l) buang cairan tersebut;
- m) masukan kolom ke dalam tabung uji yang bersih;
- n) elusi larutan DON dari kolom dengan 8 mL CH₂Cl₂ – metanol (dengan rasio 95 : 5);
- o) secara kuantitatif pindahkan eluat ke 4 buah tabung vial dan pekatkan untuk pengeringan dalam alat blok pemanas pada temperatur 60 °C di bawah hembusan nitrogen;
- p) residu akhir mewakili 2 g porsi uji.

A.10.4.3 Prosedur derivatisasi

A.10.4.3.1 Derivatisasi contoh uji

- Pindahkan larutan stok DON sebanyak 10 μL ke dalam 3 tabung vial dan uapkan sampai kering;
- perlakukan residu yang berasal dari prosedur pencucian kolom (A.10.4.2) dan larutan standar (larutan stok DON) dengan cara yang sama;
- pindahkan larutan katalis 4-DMAP sebanyak 1,0 mL ke dalam tabung vial dan tambahkan 50 μL asam heptafluorobutirat anhidrat (AHFBA);
- tutup vial rapat-rapat dan panaskan di dalam blok pemanas pada temperatur 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit;
- biarkan campuran reaksi yang terderivatisasi dingin pada temperatur ruang;
- tambahkan larutan NaHCO_3 3 % sebanyak 1,0 mL ke dalam vial;
- lalu kocok selama 2 menit dan biarkan sampai terbentuk lapisan terpisah secara sempurna;
- pindahkan lapisan atas (fase organik) sebanyak 100 μL dengan alat suntik 2 tabung vial berisi 900 μL heksana;
- konsentrasi akhir dari larutan standar digambarkan sebagai DON yang ekuivalen sebagai berat/ μL , yaitu 0,1 ng/ μL ;
- konsentrasi akhir larutan uji, digambarkan sebagai analit yang tak terderivatisasi yang ekuivalen dengan berat/ μL , yaitu 0,000 2 g/ μL .

A.10.4.4 Kromatografi Gas

Analisis kromatografi gas harus dilakukan dengan hari yang sama dengan proses derivatisasi

A.10.4.4.1 Kondisi-kondisi pengoperasian

- Gas pembawa, $\text{CH}_4\text{-Ar}$ (dengan rasio 5 : 95);
- laju alir 60 mL/menit;
- kecepatan penggambaran grafik 0,5 cm/menit;
- diseting atenuasi untuk memberikan FSD 10 % untuk 10 piko gram standar;
- port injection* 200 $^{\circ}\text{C}$;
- program temperatur : temperatur awal 175 $^{\circ}\text{C}$;
- waktu awal 10 menit;
- laju program 10 $^{\circ}\text{C}$ /menit;
- temperatur akhir 250 $^{\circ}\text{C}$;
- waktu akhir 5 menit.

A.10.4.4.2 Kurva standar

- Suntikkan standar DON yang terderivatisasi sebanyak 1 μL – 5 μL secara langsung ke dalam untuk memperoleh respon puncak;
- buat kurva standar dengan memplotkan jumlah DON yang terderivatisasi vs respon detektor untuk rentang 100 piko gram – 500 piko gram;
- respon detektor (area puncak) untuk rentang 100 piko gram – 500 piko gram secara linear;
- waktu retensi untuk derivatif DON dalam kondisi ini adalah sekitar 6,5 menit.

A.10.4.4.3 Determinasi

Suntikkan larutan uji dari prosedur derivatisasi contoh uji (A.10.5.1) sebanyak 2 µL ke dalam alat kromatografi gas dalam kondisi yang sama yang digunakan untuk menyiapkan kurva standar.

A.10.5 Perhitungan

hitung jumlah DON dalam contoh uji dengan membandingkan area puncak dari larutan uji dengan area puncak dari standar DON yang terderivatisasi dengan formula sebagai berikut:

$$\text{DON, ng/g} = (C'/C) \times (V'/V) \times (PA/PA')$$

Keterangan:

- C' adalah konsentrasi dari standar DON, dinyatakan dalam nanogram per mikroliter (ng/µL);
- V' adalah volume dari standar DON yang disuntikkan, dinyatakan dalam mikroliter (µL);
- PA adalah area puncak dari larutan uji yang disuntikkan;
- PA' adalah area puncak dari standar;
- C adalah konsentrasi larutan uji, dinyatakan dalam 0,0002 gram per mikroliter (g/µL), jika digunakan 25 g porsi uji);
- V adalah volume dari larutan uji yang disuntikkan, dinyatakan dalam mikroliter (µL).



Bibliografi

AOAC Official Method 925.11, *Ash of Macaroni Products*.

AOAC Official Method 926.07, *Solids (Total) and loss on Drying (Moisture) in Macaroni Products*.

AOAC Official Method 930.25, *Protein in Macaroni Products*.

AOAC Official Method 971.21, *Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*.

AOAC Official Method 985.16, *Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*.

AOAC Official Method 986.15, *Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*.

AOAC Official Method 986.18, *Deoxynivalenol in Wheat, Gas Chromatographic Method*.

AOAC Official Method 999.11, *Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*.

AOCS Official Method Ba 5b-68. *Acid-Insoluble Ash*. 6th Edition.

CODEX STAN 249-2006. *Codex Standard for Instant Noodles*

ISO 4833:2003. *Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C*.